

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re New Patent Application of)
Rainer UHL et al.)
Application No. Not Yet Assigned) Attn: Applications
Filed: On even date) Branch
For: APPARATUS FOR TOTAL INTERNAL)
REFLECTION MICROSCOPY) Date: March 3, 2004

CLAIM FOR CONVENTION PRIORITY

Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

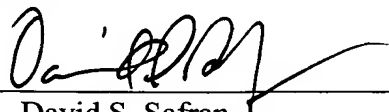
Sir:

The benefit of the filing date of the following prior foreign application in the following foreign country is hereby requested, and the right of priority provided in 35 U.S.C. § 119 is hereby claimed:

<u>COUNTRY</u>	<u>APPLICATION NO.</u>	<u>MONTH/DAY/YEAR</u>
Germany	103 09 269.2	March 3, 2003

In support of this claim, enclosed is a certified copy of said prior foreign application. Acknowledgment of receipt of this certified copy is requested.

Respectfully submitted,

By: 
David S. Safran
Registration No. 27,997

NIXON PEABODY LLP
401 9th Street, N.W.
Suite 900
Washington, DC 20004-2128
Telephone: (703) 827-8094

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 103 09 269.2
Anmeldetag: 03. März 2003
Anmelder/Inhaber: TILL Photonics GmbH, 82166 Gräfelfing/DE
Erstanmelder: TILL I.D. GmbH, 82166 Gräfelfing/DE
Bezeichnung: Vorrichtung für Totale Interne Reflexions-Mikroskopie
IPC: G 02 B 21/06

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 15. Januar 2004
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Wallner

TILL I.D. GmbH
Bahnhofstraße 89
D-82166 Gräfelfing

5

Vorrichtung für Totale Interne Reflexions-Mikroskopie

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Vorrichtung zur Totalen Internen Reflexions-Mikroskopie gemäß dem Oberbegriff von Anspruch 1 bzw. 16.

10

Das Prinzip der totalen internen Reflexion (TIR), welches einen Lichtstrahl ab einem bestimmten Einfallswinkel am Austritt aus einem optisch dichteren in ein optisch dünneres Medium hindert, wird in zunehmendem Maße in der Aufsicht-Fluoreszenzmikroskopie genutzt (totale interne Reflexions-Fluoreszenz, TIRF). Dabei wird von der Tatsache Gebrauch gemacht, dass das elektromagnetische Feld des totalreflektierten Lichtstrahls sich bis in das optisch dünnere Medium hinein erstreckt und dort in der Lage ist, fluoreszierende Moleküle anzuregen. Die Eindringtiefe dieses sog. evaneszenten Felds hängt von der Wellenlänge und dem Reflexionswinkel ab und beträgt üblicherweise einige hundert Nanometer. Damit ist es möglich, unmittelbar in der Nähe der Grenzfläche befindliche Fluorophore von weiter entfernten zu unterscheiden. Ein für Totalreflexion ausreichend flacher Winkel im Substrat kann entweder dadurch erreicht werden, dass der anregende Lichtstrahl seitlich in das Trägersubstrat eingekoppelt wird, oder dadurch, dass unter Zuhilfenahme spezieller Immersions-Objektive mit außerordentlich hoher numerischer Apertur Licht unter einem Winkel durch das Objektiv geschickt wird, welcher größer ist als der Grenzwinkel der Totalreflexion.

20

Gewöhnlich dienen Laser als Lichtquellen für die TIR-Aufsichtfluoreszenz. Es wird dabei ein beugungslimitierter Laserfokus in die rückwärtige Brennebene eines dafür geeigneten, hochaperturigen Objektivs projiziert. Beim Durchtritt durch das Objektiv wird das Laserlicht kollimiert, wobei die genaue Fokus-Position in der Objektivpupille den Einstrahlwinkel auf der Probe vorgibt, und zwar nach der Gleichung:

$$\sin \alpha = r / (n f)$$

- r: Abstand des Laserfokus von der optischen Achse;
n: Brechungsindex des Substrats bzw. des Immersionsmediums;
f: Brennweite des Objektivs

5 Um den Laserfokus in die gewünschte Fokusposition in der Objektivpupille zu bringen, wird das Laserlicht üblicherweise mittels eines Strahlteilers in die Objektivpupille eingekoppelt. Falls die Justage des Laserstrahls auf dem Strahlteiler fehlerhaft ist, kann Laserlicht in Bereiche der Objektivpupille gelangen, die nicht zur Totalreflektion führen.

10 Die Wahl eines Lasers als bevorzugte Lichtquelle bei der TIR-Auflichtfluoreszenz resultiert aus der geringen Beleuchtungstiefe der TIR-Anordnung. Es werden gewöhnlich nur wenige Fluorophore angeregt, weswegen die resultierenden Signale häufig sehr schwach sind. Wo die Detektor-Empfindlichkeit nicht mehr gesteigert werden kann, muss deshalb im Interesse eines guten Signal-Rauschverhältnisses die Anregungsenergie gesteigert werden. Dafür werden Laser eingesetzt, die einer hohen Laserschutzklasse angehören. Bei solchen Lasern kann es schon bei kleinsten Veränderungen an der Strahljustage zu einer massiven Gefährdung des
15 Experimentators kommen kann. Dies gilt vor allem dann, wenn der Grenzwinkel der Totalreflexion unterschritten wird und der Laserstrahl dann ungehindert (und unter einem sehr flachen Winkel) aus der Probe austritt und ins Auge des Experimentators gelangen kann.

20 Aus der US 2002/0097489 A1 ist eine Vorrichtung gemäß dem Oberbegriff von Anspruch 16 bekannt, wobei für die TIR-Beleuchtung ausschließlich Weißlicht verwendet wird, welches eine ringförmige Blende durchläuft, bevor es über einen separaten Strahlteiler mittels Reflexion in des Objektiv eingekoppelt wird. Die Einkoppelung von normalem Auflicht bzw. die Auskoppelung des von der Probe emittierten Lichts erfolgt ebenfalls über diesen Strahlteiler oder über einen zusätzlichen Strahlteiler. Nachteilig ist der relativ komplizierte Aufbau.

25 Es ist eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, eine TIR-Mikroskopievorrichtung mit einem Einkoppelement für Licht zur TIR-Beleuchtung und gleichzeitig für Licht aus einer anderen Lichtquelle zur Auflichtbeleuchtung zu schaffen, welche einen wirksamen Schutz gegen Fehlbedienung bei der Justage bietet und auch insbesondere für die Verwendung von Lasern mit hoher Ausgangsleistung geeignet ist sowie besonders einfach aufgebaut ist.

Diese Aufgabe wird durch eine TIR-Mikroskopievorrichtung gemäß Anspruch 1 bzw. 16 gelöst. Hierbei ist vorteilhaft, dass Laserlichtstrahlen, die unter Bedingungen eingekoppelt werden, die nicht zu TIR führen - und somit nahezu ungedämpft aus der Probe austreten könnten - bereits durch das Einkoppelement ausgeblendet werden. Ferner ist der einfache Aufbau vorteilhaft, wobei das Einkoppelement nicht nur zum Einkoppeln des TIR-Anregungslichts sondern zugleich zum Einkoppeln von normalem Auflicht und/oder zum Auskoppeln von Emissionslicht von der Probe dient. Dadurch kann gleichzeitig eine andere wesentliche Anforderung an praxisnahe TIRF-Systeme erfüllt werden: es kann die Möglichkeit realisiert werden, die durch TIRF-Verfahren gewonnene Information durch klassische Auflichtverfahren zu ergänzen, indem die Probe entweder gleichzeitig oder kurz nach der Beleuchtung mit Licht zur TIRF-Anregung mit normalem Auflicht beleuchtet wird.

Bevorzugte Ausgestaltungen der Erfindung ergeben sich aus den Unteransprüchen.

Im folgenden wird die Erfindung anhand der beigefügten Zeichnungen näher erläutert. Dabei zeigen:

15 Fig. 1 schematisch eine Aufsicht einer Ausführungsform der Erfindung mit einem Mikroskopobjektiv und einem Einkoppelement in der Brennebene des Mikroskopobjektivs;

Fig. 2 eine Aufsicht einer weiteren Ausführungsform mit einem Einkoppelement in einer zur Brennebene konjugierten Ebene;

20 Fig. 3 eine Frontalansicht einer scheibenförmigen Ausführungsform eines Einkoppelements für Laserlicht;

Fig. 4 Frontalansicht einer scheibenförmigen Ausführungsform eines Einkoppelements für nichtkohärentes Licht; und

Fig. 5 eine Seitenansicht einer Ausführungsform eines Einkoppelements für nichtkohärentes Licht in Form eines abgeschnittenen Konus.

25 Fig. 1 zeigt schematisch ein Mikroskopobjektiv 10, welches auf eine Probe 12 gerichtet ist. Die Probe ist auf ein transparentes Substrat 14 (zumeist Glas) aufgebracht. Zwischen dem Substrat und dem Mikroskopobjektiv befindet sich ein Immersionsmedium 16. In der

probenabgewandten Brennebene des Mikroskopobjektivs befindet sich ein Einkoppelement 24.

Bei der gezeigten Anordnung handelt sich um eine Anordnung zur Totalen Internen Reflexions (TIR)-Mikroskopie, bei der die TIR-Beleuchtung mit Anregungsstrahlen 19 erfolgt, die durch das Mikroskopobjektiv 10 auf die Probe 12 abgebildet werden. Als TIR-Grenzfläche kommt dabei der Übergang vom Substrat 14, dessen Brechungsindex gleich dem des Immersionsmediums 16 ist und gewöhnlich ca. 1,5 beträgt, zur Probe 12 in Frage. Bei biologischen Proben ist letzteres zumeist wässriger Natur und besitzt einen Brechungsindex von 1,33 – 1,36. Der damit einhergehende Grenzwinkel der Totalreflexion beträgt $62,5 - 65^\circ$.

Die einfallenden Strahlen 19 für die TIR-Beleuchtung werden in einen ersten, TIR-Beleuchtungslicht transmittierenden, streifenförmig ausgebildeten Bereich 20 des Einkoppelements 24 in einen Fokus 18 abgebildet und durchlaufen anschließend das Mikroskopobjektiv 10, welches sie als parallelen Strahl in Richtung Substrat 14 verlassen. Der Einstrahlwinkel Θ zwischen diesem Strahl und der Objektivachse 15 ist hierbei durch den Abstand des Fokus 18 in der Objektivbrennebene in radialer Richtung von der optischen Achse 15 vorgegeben. Je größer der Abstand zur Achse 15 ist, umso größer ist der Einstrahlwinkel.

Der für das Laserlicht durchlässige Bereich 20 des Einkoppelements 24 ist nun hinsichtlich seiner Begrenzungen so gewählt, dass nur Laserlicht transmittiert werden kann, welches aufgrund des radialen Abstandes von der optischen Achse unter Winkeln, bei welchen TIR stattfindet, auf das Substrat gelangen kann. Dabei ist vorteilhaft, dass auf diese Weise sichergestellt ist, dass kein Laserlicht die Probe durchstrahlen und das Signal-Rauschverhältnis der Messung oder den Experimentator gefährden kann.

Das Einkoppelement 24 ist entlang einer Achse, die durch den Bereich 20 und einen weiteren Bereich 22 geht, bezüglich der optischen Achse 15 gekippt (der projizierte Umriss des Einkoppelements ist mit der Linie 29 angedeutet). Wenn der zweite, innere Bereich 25 des Einkoppelements für das gewählte Auflicht reflektierend ist, kann damit die Auflichtbeleuchtung entlang einer Achse senkrecht zur Bildebene von Fig. 1 erfolgen. Auch eine umgekehrte Version (Laserlicht für TIR wird reflektiert und klassische Auflichtbeleuchtung wird transmittiert) kann realisiert werden.

Es versteht sich, dass der zweite Bereich 25 in analoger Weise auch zum Auskoppeln des von der Probe 12 aufgrund der TIR-Beleuchtung emittierten Lichts verwendet werden kann. Dabei ist der zweite Bereich 25 für das Emissionslicht reflektierend.

Total reflektiertes Laserlicht 21 wird durch den Bereich 22 zurückgeführt.

- 5 Bei der Ausführungsform gemäß Fig. 2 befindet sich ein Einkoppelement 124 in einer zur objektabgewandten Objektivbrennebene eines Mikroskopobjektivs 10 konjugierten Ebene. Dort können (wie auch in der objektabgewandten Objektivbrennebene selbst) unterschiedliche Beleuchtungsstrahlengänge, solange sie dort keine räumliche Überlappung besitzen, ohne Verwendung von Strahlteilerplättchen miteinander kombiniert werden, indem das Einkoppelement mit einer selektiven Verspiegelung versehen wird. In der gezeigten Ausführungsform ist einfallendes Laserlicht zur TIR-Beleuchtung 119 auf einen ersten Bereich 120 des Einkoppelements 124 fokussiert, der für die TIR-Beleuchtung transparent ist. Mit zwei Linsen 123 und 127 wird der so entstandene Fokus 118 auf die probenabgewendete Brennebene des Mikroskopobjektivs in einen Fokus 126 abgebildet. Der weitere Strahlverlauf ist identisch zu dem in Fig. 1 gezeigten. Der reflektierende zweite Bereich ist mit 125 bezeichnet.

Weiterhin sind in Fig. 2 zwei Detektoren 6 und 8 schematisch gezeigt. Mit dem Detektor 6 kann ein Signal gemessen werden, welches proportional zur Leistung der TIR-Beleuchtung 119 ist, und mit dem Detektor 8 kann entsprechend die Leistung des total reflektierten Lichts 121 bestimmt werden, welches in den Bereich 122 abgebildet wird. Die Auskoppelung des zu messenden Lichts erfolgt z.B. über einen Strahlteiler 140. Verlässt nun das Verhältnis der beiden Lichtleistungen einen definierten Arbeitsbereich, d.h. wird durch Fehljustage der Bereich der TIR verlassen, so reduziert eine nicht gezeigte Schutzabschaltungseinrichtung die Laserintensität entsprechend, um Gefährdungen auszuschließen.

- 25 Fig. 3 zeigt eine Ausführungsform eines Einkoppelements für Laserlicht einer TIR-Beleuchtung in einer Frontalansicht. Ein das TIR-Beleuchtungslicht transmittierender, erster Bereich beschränkt sich auf zwei schlitzzartig ausgebildete Streifen 222 und 220 in den Außenbereichen mit $NA > 1,35$. Auf den Streifen 220 wird das Laserlicht zur Beleuchtung der Probe fokussiert. Durch den Streifen 222 wird an der Probe totalreflektiertes Licht

zurückgeführt. Dieses Einkoppelement wird entsprechend dem Einkoppelement 124 aus Fig. 2 verkippt in den Strahlengang eingebaut. Ein das Auflicht reflektierender zweiter Bereich umfasst eine innere Ellipse 225, deren kleinerer Durchmesser der durch das Auflicht nutzbaren numerischen Apertur des Objektivs entspricht und deren größerer Durchmesser der projizierten (durch den Cosinus des Verkippfungswinkels dividierten) nutzbaren numerischen Apertur des Objektivs entspricht. Bei wässrigen Medien entspricht das dem Bereich zwischen $NA = 0$ und $NA = 1,35$. Zur leichteren Justage und Zentrierung kann es vorteilhaft sein, auch noch eine Öffnung 226 des inneren Kreises transparent auszulegen, was wegen der geringen erforderlichen Flächen für die Lichtausbeute des normalen Auflichtstrahls keine Rolle spielt.

Die bisher beschriebene Variante eines Einkoppelements eignet sich vor allem für die Verwendung von Lasern zur TIRF Anregung. Will man die Flexibilität einer inkohärenten Lichtquelle nutzen, die nicht auf einige wenige Laserlinien beschränkt ist, steht man zumeist vor einem Intensitätsproblem. Dies erfordert die Nutzung nicht nur eines einzelnen Beleuchtungsstrahls, sondern einer Strahlenschar, die alle einen Winkel größer dem der Totalreflexion aufweisen. Der geometrische Ort, den alle „nutzbaren“ Strahlen zu durchlaufen haben, ist ein Kreisring in der Objektivpupille, dessen innerer Radius r_g dem Grenzwinkel der Totalreflexion, und dessen äußerer Radius r_o dem Maximalwinkel des Objektivs (d.h. seiner NA) entspricht.

Fig. 4 zeigt eine scheibenförmige Ausführungsform eines Einkoppelements für nichtkohärentes Licht. Ein erster Bereich, der für das Licht der TIR-Beleuchtung transparent ist, beschränkt sich hier auf einen Ring 322 in den Außenbereichen mit $NA > 1,35$. Auf den Ring wird das Licht zur Beleuchtung fokussiert. Ein zweiter Bereich, der für das Licht eine Auflichtbeleuchtung reflektieren ist, umfasst eine innere Ellipse 325, welcher der Projektion der durch Auflicht nutzbaren numerischen Apertur des Objektivs entspricht.

Fig. 5 zeigt eine alternative Ausführungsform eines Einkoppelements für nichtkohärentes Licht. Es handelt sich um einen Volumenkörper 40 in Form eines Kegels, dessen Mantel einen Winkel β zur Grundfläche einnimmt und dessen Spitze in einem Winkel γ zur Grundfläche abgeschnitten ist. Licht 42 zur TIR-Beleuchtung wird durch die kreisförmige, verspiegelte Grundfläche 44 daran gehindert, die Probe unter Winkeln kleiner als der Grenzwinkel der

Totalreflexion zu erreichen. Die elliptisch geformte Schnittfläche 46 ist ebenfalls verspiegelt, um ein einfallendes Licht zur Auflichtbeleuchtung 48 entlang der Beleuchtungsschar 50 in ein Mikroskopobjektiv 10 einkoppeln zu können.

- 5 Obwohl eine Verkippung des Einkoppelements 24, 124 bezüglich der optischen Achse bevorzugt wird, ist dies nicht zwingend erforderlich. So könnte stattdessen das Einkoppelement so ausgebildet sein, dass die Transmission des zweiten Bereichs dergestalt wellenlängenabhängig ist, dass das Licht für die TIR-Beleuchtung nicht transmittiert wird, jedoch das Licht für die Auflichtbeleuchtung bzw. das von der Probe emittierte Licht transmittiert wird.

Ansprüche

1. Vorrichtung für Totale Interne Reflexions-Mikroskopie (TIR) einer Probe, wobei in der probenabgewandten Brennebene eines Mikroskopobjektivs (10) oder in einer hierzu konjugierten Ebene ein Einkoppelement (24, 124) vorgesehen ist, welches einen ersten Bereich (20, 120, 220, 322) aufweist, von dem Licht zum Beleuchten des Objektivs für eine TIR-Beleuchtung der Probe ausgeht, wobei der Abstand der bezüglich der optischen Achse (15) des Objektivs innenliegenden Begrenzung des ersten Bereichs von der optischen Achse des Objektivs so gewählt ist, dass das von dem ersten Bereich in das Objektiv ausgehende Licht von dem Objektiv unter Winkeln auf die Probe (12) abgebildet wird, die zur Totalreflektion dieses Lichts führen, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Einkoppelement (24, 124) einen zweiten Bereich (25, 125, 225, 325) aufweist, welcher von dem ersten Bereich räumlich getrennt und ohne Überlapp mit diesem ist und ausgebildet ist, um von der Probe (12) emittiertes Licht, welches den Anregungsstrahlengang in umgekehrter Richtung durchläuft, aus dem Anregungsstrahlengang auszukoppeln und/oder um Licht für eine Auflichtbeleuchtung der Probe in das Objektiv (10) einzukoppeln.
2. Vorrichtung gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei dem Licht für die TIR-Beleuchtung des Probe (12) um Laserlicht handelt.
3. Vorrichtung gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass der erste Bereich (20, 120, 220, 322) für das Laserlicht durchlässig ist.
4. Vorrichtung gemäß Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass der zweite Bereich (25, 225, 325) für von der Probe emittiertes Licht und/oder für Licht zum Beleuchten des Objektivs (10) für eine Auflichtbeleuchtung der Probe (12) reflektierend ist.
5. Vorrichtung gemäß Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass der erste Bereich (20, 120, 220) als Öffnung in einer reflektierenden Scheibe ausgebildet ist.
6. Vorrichtung gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass der erste Bereich (20, 120, 220, 322) für Laserlicht zum Beleuchten des Objektivs (10) für eine TIR-Beleuchtung der Probe (12) reflektierend ist.

7. Vorrichtung gemäß Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass das Einkoppelement (24, 124) außerhalb des ersten Bereichs (20, 120, 220, 322) für Laserlicht zum Beleuchten des Objektivs für eine TIR-Beleuchtung der Probe (12) durchlässig ist.
8. Vorrichtung gemäß Anspruch 6 oder 7, dadurch gekennzeichnet, dass das Einkoppelement (24, 124) außerhalb des ersten Bereichs (20, 120, 220, 322) für von der Probe emittiertes Licht und/oder für Licht zum Beleuchten des Objektivs für eine Auflichtbeleuchtung der Probe (12) durchlässig ist.
9. Vorrichtung gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das Einkoppelement (24, 124) schiefwinklig zu der probenabgewandten Brennebene des Objektivs (10) oder der hierzu konjugierten Ebene liegt.
10. Vorrichtung gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass der erste Bereich (20, 120, 220) als streifenförmiger erster Abschnitt ausgebildet ist, der sich in radialer Richtung bezüglich der optischen Achse (15) des Objektivs (10) erstreckt.
11. Vorrichtung gemäß Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass ein zweiter Abschnitt (22, 122, 222) vorgesehen ist, der bezüglich der optischen Achse (15) des Objektivs (10) punktsymmetrisch zu dem ersten Abschnitt (20, 120, 220) angeordnet ist, um mittels des ersten Abschnitts zur Probe gebrachtes und dort total-reflektiertes Laserlicht (21, 121) durchzulassen bzw. zu reflektieren.
12. Vorrichtung gemäß Anspruch 11, sofern auf Anspruch 9 zurückbezogen, dadurch gekennzeichnet, dass das Einkoppelement (24, 124) um eine Achse, die durch die Mitte der beiden Streifen geht, gekippt ist und schiefwinklig zu der probenabgewandten Brennebene des Objektivs (10) oder der hierzu konjugierten Ebene steht.
13. Vorrichtung gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das Einkoppelement (24, 124) die Form einer kreisförmigen oder elliptischen Scheibe hat.
14. Vorrichtung gemäß Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass der erste Bereich (20, 120, 22, 322) des Einkoppelements (24, 124) sich in radialer Richtung nur über Radien

erstreckt, denen in der konjugierten Brennebene des Mikroskopobjektivs (10) eine numerische Apertur von größer als 1,35 entspricht.

15. Vorrichtung gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das Zentrum des Einkoppelements einen Abschnitt (226) aufweist, um das Objektiv (10) mit TIR-Beleuchtungs-Laserlicht für Justagezwecke zu beleuchten.
16. Vorrichtung für Totale Interne Reflexions (TIR)-Mikroskopie einer Probe, wobei in der probenabgewandten Brennebene eines Mikroskopobjektivs (10) oder in einer hierzu konjugierten Ebene ein Einkoppelement (40) vorgesehen ist, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Einkoppelement einen ersten Bereich (44) aufweist, der für Licht zum Beleuchten des Objektivs für eine TIR-Beleuchtung der Probe undurchlässig ist, wobei der Abstand der äußeren Rands des ersten Bereichs von der optischen Achse (15) des Objektivs (10) so gewählt ist, dass Licht, welches den ersten Bereich randseitig überstrahlt und in das Objektiv fällt, von dem Objektiv unter Winkeln auf die Probe abgebildet wird, die zur Totalreflektion dieses Lichts führen, und wobei der erste Bereich ausgebildet ist, um von der Probe (12) emittiertes Licht, welches den Anregungsstrahlengang in umgekehrter Richtung durchläuft, aus dem Anregungsstrahlengang auszukoppeln und/oder um Licht für eine Auflichtbeleuchtung der Probe in das Objektiv einzukoppeln.
17. Vorrichtung gemäß Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass der erste Bereich (44) für von der Probe emittiertes Licht und/oder für Licht zum Beleuchten des Objektivs für eine Auflichtbeleuchtung der Probe reflektierend ist.
18. Vorrichtung gemäß Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, dass der erste Bereich (44) von einer dem Licht zum Beleuchten des Objektivs (10) für eine TIR-Beleuchtung der Probe (12) zugewandten ersten Fläche (44), die für dieses Licht undurchlässig ist, und einer zu der ersten Fläche unter einem Winkel angeordneten zweiten Fläche (46) gebildet wird, die für von der Probe emittiertes Licht und/oder für Licht zum Beleuchten des Objektivs für eine Auflichtbeleuchtung der Probe reflektierend ist.

19. Vorrichtung gemäß Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, dass die erste Fläche (44) als reflektierende kreisförmige Fläche ausgebildet ist und senkrecht zu dem Licht zum Beleuchten des Objektivs (10) für eine TIR-Beleuchtung der Probe (12) steht.
20. Vorrichtung gemäß Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, dass zweite Fläche (46) als Schnittfläche einer Ebene unter einem schiefen Winkel mit einem realen oder imaginären Konus ausgebildet ist, dessen Grundfläche von ersten Fläche (44) gebildet wird.
21. Vorrichtung gemäß Anspruch 16 bis 20, dadurch gekennzeichnet, dass die Lichtquelle für die TIR-Beleuchtung eine nicht-kohärente Lichtquelle ist.
22. Vorrichtung gemäß Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, dass der erste Bereich ringförmig ausgebildet ist.
23. Vorrichtung gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das auf das Einkoppelement (12, 124) auftreffende Licht für die TIR-Beleuchtung und das auf das Einkoppelement auftreffende Licht für die Auflichtsbeleuchtung einen Winkel von etwa 90° bilden.
24. Vorrichtung gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass eine Einrichtung (6) zur Erfassung der Intensität des das Objektiv (10) für die TIR-Beleuchtung beleuchtende Lichts und eine Einrichtung (8) zur Erfassung der Intensität des von der Probe total-reflektierten Lichts sowie eine Steuereinrichtung vorgesehen sind, wobei die Steuereinrichtung so ausgebildet ist, dass sie die Intensität des Lichts für die TIR-Beleuchtung unter einen vorbestimmten Grenzwert steuert, wenn das Verhältnis der Intensität des Lichts für die TIR-Beleuchtung und der Intensität des an der Probe total-reflektierten Lichts einen vorbestimmten Grenzwert überschreitet.
25. Vorrichtung gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Vorrichtung für eine Fluoreszenzbetrachtung der Probe ausgebildet ist.

Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft eine Vorrichtung für die Totale Interne Reflexions-Mikroskopie (TIR) einer Probe, wobei in der probenabgewandten Brennebene eines Mikroskopobjektivs (10) oder in einer hierzu konjugierten Ebene ein Einkoppelement (24, 124) vorgesehen ist, welches einen ersten Bereich (20, 120, 220, 322) aufweist, von dem Licht zum Beleuchten des Objektivs für eine TIR-Beleuchtung der Probe ausgeht, wobei der Abstand der bezüglich der optischen Achse (15) des Objektivs innenliegenden Begrenzung des ersten Bereichs von der optischen Achse des Objektivs so gewählt ist, dass das von dem ersten Bereich in das Objektiv ausgehende Licht von dem Objektiv unter Winkeln auf die Probe (12) abgebildet wird, die zur Totalreflektion dieses Lichts führen. Das Einkoppelement (24, 124) weist dabei einen zweiten Bereich (25, 225, 325) auf, welcher von dem ersten Bereich räumlich getrennt und ohne Überlapp mit diesem ist und ausgebildet ist, um von der Probe (12) emittiertes Licht, welches den Anregungsstrahlengang in umgekehrter Richtung durchläuft, aus dem Anregungsstrahlengang auszukoppeln und/oder um Licht für eine Auflichtbeleuchtung der Probe in das Objektiv einzukoppeln.

(Fig. 2)

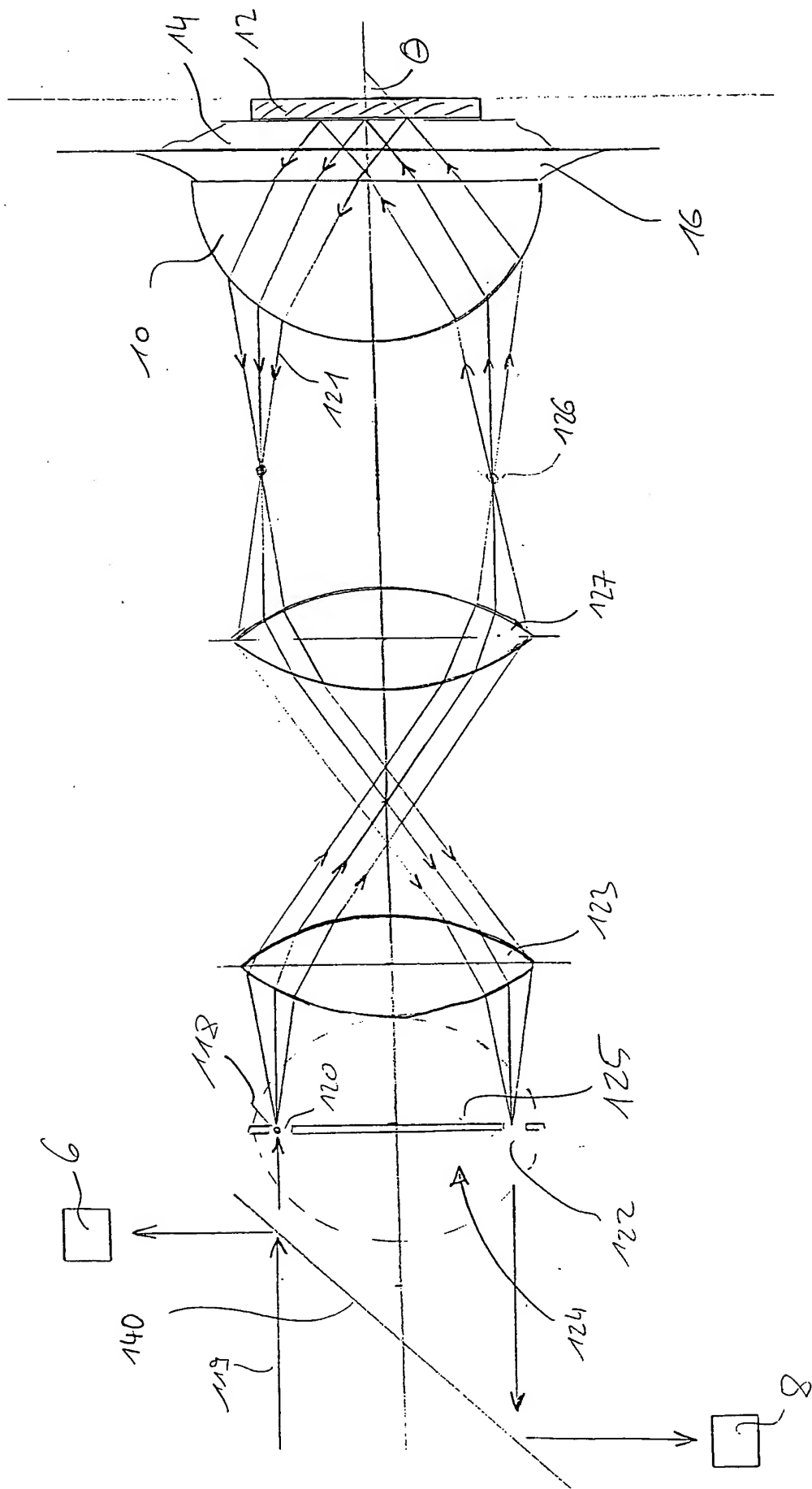


Fig 2

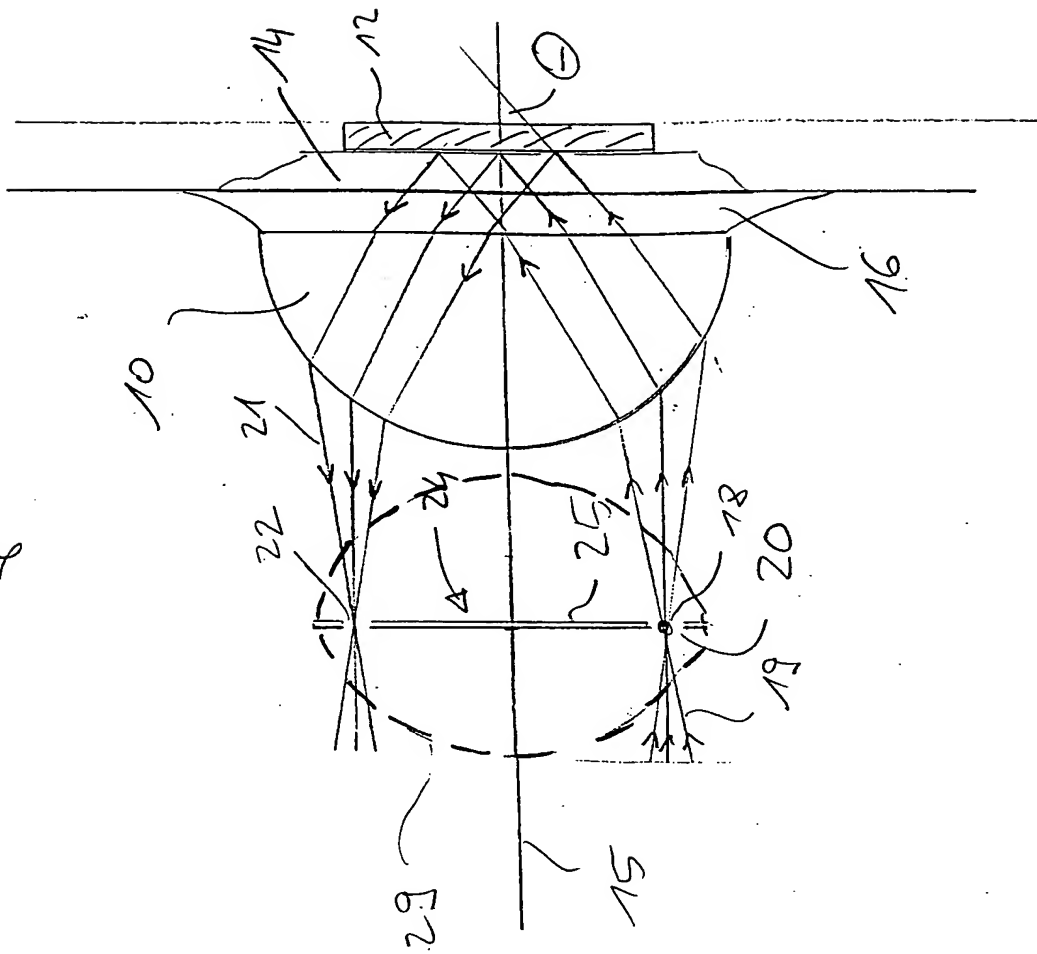


Fig 2

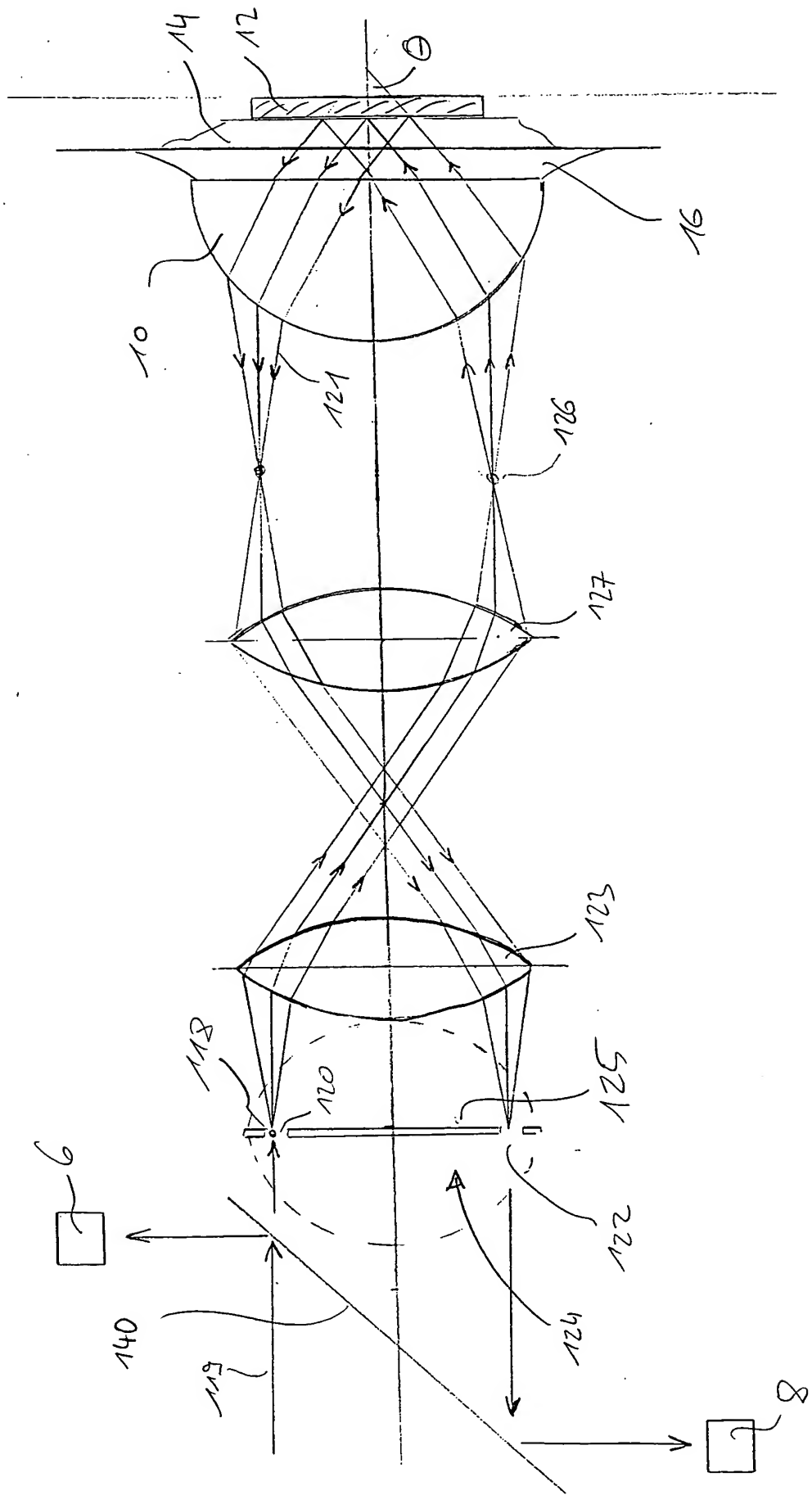


Fig 4

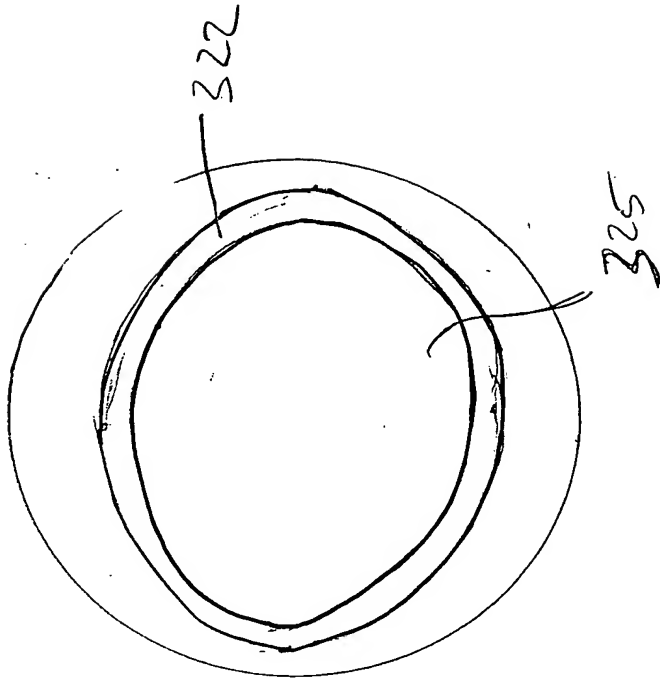


Fig 3

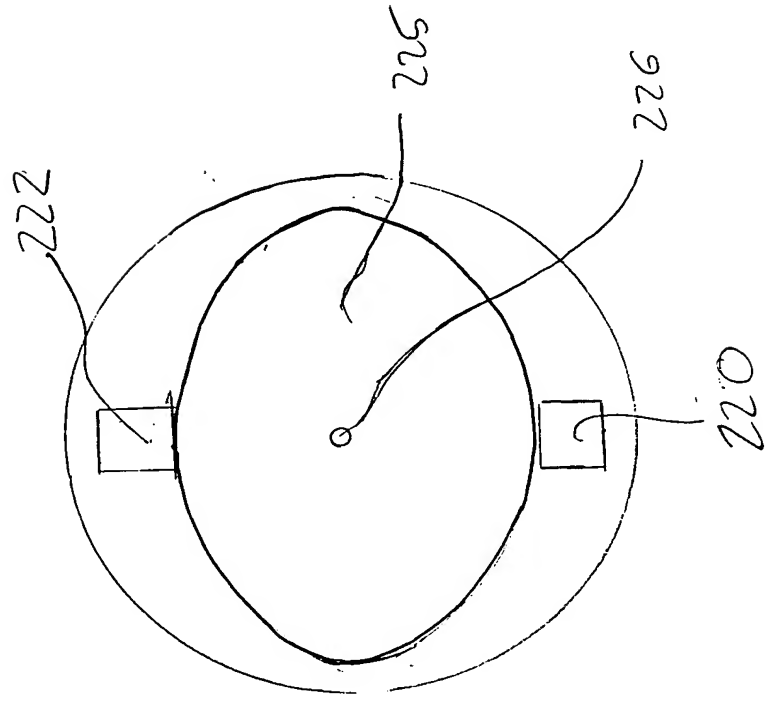
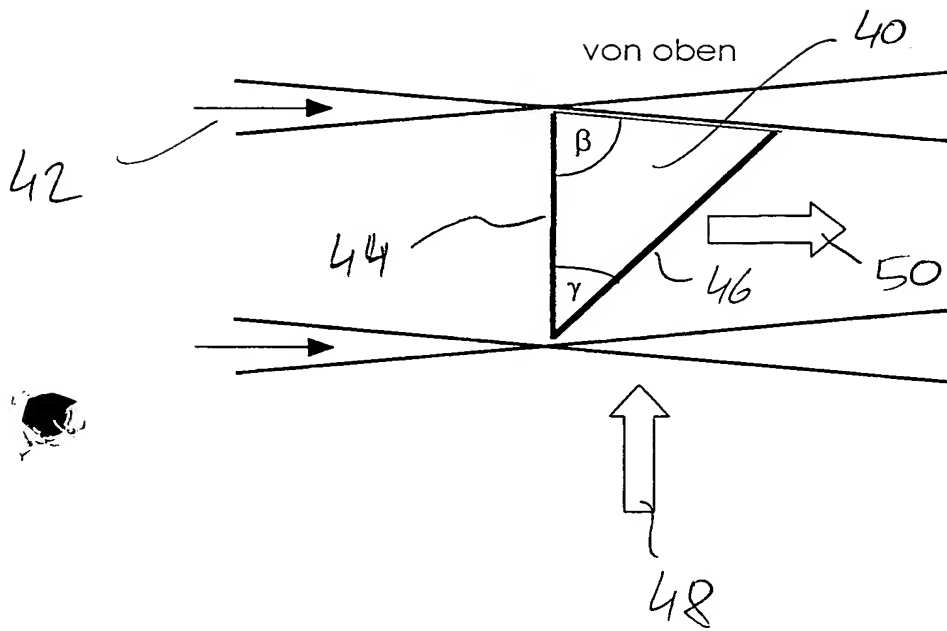


Fig 5



von vorn

